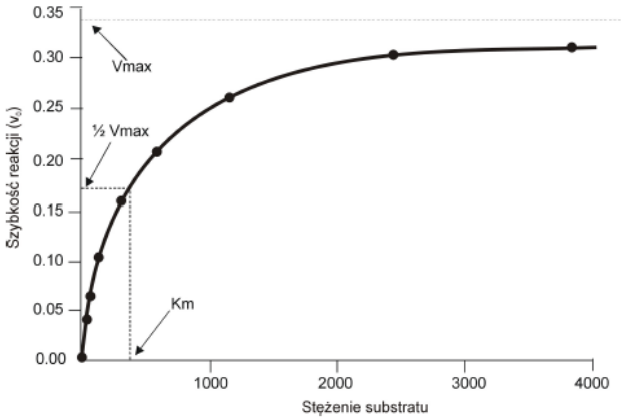
3. Badanie kinetyki enzymów

Szybkości reakcji katalizowanej enzymatycznie, wyrażanej jako liczba moli substratu przetworzonego przez dany enzym w jednostce czasu, zmienia się wraz ze wzrostem stężenia substratu w sposób pokazany na rysunku 1.



Rys. 1. Zależność szybkości reakcji enzymatycznej w funkcji stężenia substratu

Początkowy wzrost szybkości reakcji katalizy ma charakter liniowy i jest proporcjonalny do wzrostu stężenia substratu. Maksymalna szybkość reakcji (V_{MAX}) osiągnięta zostaje przy wysokich stężeniach substratu, kiedy następuje całkowite wysycenie enzymu substratem. Dalsze zwiększanie stężenia substratu nie może już wpłynąć na wzrost szybkości reakcji.

Najprostszy model tłumaczący kinetykę wielu enzymów zaproponowany został w 1913 roku przez L. Michaelisa i M. Menten:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \qquad (1)$$

Enzym (E) łączy się z substratem (S) tworząc kompleks ES ze stałą szybkości k_1. Istnieją dwie możliwe drogi rozpadu kompleksu ES. Może on dysocjować do (E) i (S) ze stałą szybkości k_{-1} lub może się przekształcać ze stałą szybkości k_2 w produkt (P). Szybkość reakcji enzymatycznej (katalizy) jest równa iloczynowi stężenia kompleksu ES i stałej szybkości k_2:

$$\mathbf{V = k_2 \times [ES]} \qquad (2)$$

Szybkość powstawania kompleksu (ES) $V = k_1 \times [E] \times [S]$ (3)

Szybkość rozpadu kompleksu (ES) $V = k_{-1} \times [ES] + k_2 \times [ES] = (k_{-1} + k_2) \times [ES]$ (4)

Birgs i Halden w 1925 roku założyli występowanie tzw. **stanu stacjonarnego** w trakcie reakcji katalizowanej enzymatycznie. Jest to taki moment reakcji, w którym stężenie kompleksu ES jest stałe - szybkość powstawania kompleksu ES równa się sumie szybkości jego rozpadu w kierunku produktu (P) oraz substratu (S).

$$k_1 \times [E] \times [S] = (k_{-1} + k_2) \times [ES] \qquad (5)$$

Przekształcenie tego równania pozwala na zdefiniowanie **stałej Michaelisa** (K_M)

$$\frac{[E] \times [S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_M \qquad (6)$$

czyli

$$[ES] = \frac{[E] \times [S]}{K_M} \qquad (7)$$

Stężenie enzymu [E] w powyższym wzorze jest stężeniem enzymu wolnego, niezwiązanego w kompleksie ES. Równe jest całkowitemu (początkowemu) stężeniu enzymu (E_c) pomniejszonemu o stężenie kompleksu ES. Można więc napisać:

$$[E]_C = [E] + [ES] \Longrightarrow [E] = [E]_C - [ES] \qquad (8)$$

Po podstawieniu do równania 7

$$[ES]=\frac{([E]_C - [ES])\times[S]}{K_M} \qquad (9)$$

Jak zostało wspomniane na początku, szybkość reakcji enzymatycznej wyraża się za pomocą równania 2:

$$\mathbf{V = k_2\times[ES]}$$

Przekształcając równanie (9) i podstawiając do równania (2) otrzymujemy:

$$V = k_2\times[E]_C\times\frac{[S]}{[S] + K_M} \qquad (10)$$

gdzie: stała $k_2 = k_{cat}$ (zdefiniowana jako stała katalityczna)

Maksymalną szybkość reakcji V_{max} uzyskuje się wtedy, kiedy wszystkie miejsca enzymu są wysycane przez substrat, to znaczy, kiedy stężenie $[S]>>K_M$, czyli $[S]/([S]+K_M)$ z równania 10 jest bliskie 1. Stąd:

$$V_{MAX} = k_2\times E_C \qquad (11)$$

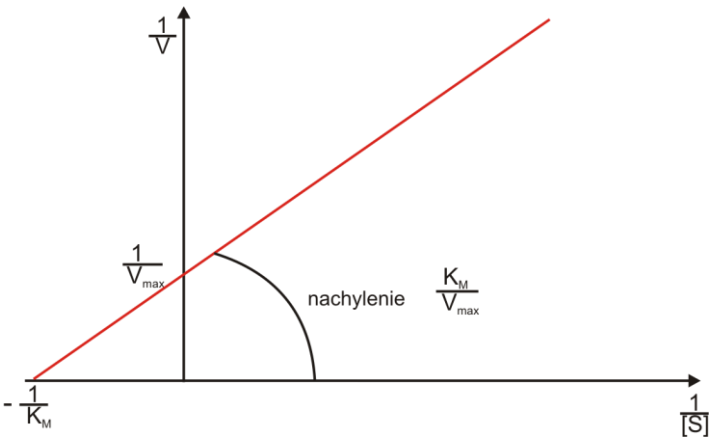
W wyniku podstawienia równania (11) do równania (10) otrzymuje się równanie Michaelisa-Menten:

$$V = V_{MAX}\times\frac{[S]}{[S] + K_M} \qquad (12)$$

Rozwiązaniem równania (12) jest krzywa przedstawiona na rysunku 1. Równanie Lineweavera-Burka (13) jest przekształceniem równania Michaelisa Menten:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{MAX}}\times\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{MAX}} \qquad (13)$$

y = ax + b



Rys. 2. Krzywa Lineweavera-Burka

Przekształcenie to ma na celu uzyskanie równania o ogólnej postaci linii prostej (y = ax + b). Wartość K_M/V_{max} (współczynnik regresji *a*) i $1/V_{max}$ (*b*) są wielkościami stałymi, stąd zależność 1/V (y) od 1/[S] (x) jest linią prostą. Jej nachylenie określa zawsze stosunek K_M/V_{max} (współczynnik *a*) i która przecina oś y (czyli 1/V) w punkcie wyznaczającym $1/V_{max}$.

Zadaniem niniejszego doświadczenia będzie wyznaczenie parametrów kinetycznych (V_{max}, $k_{cat} = V_{max}/E_C$, K_M i k_{cat}/K_M) w układzie enzym – substrat. Stosowana w doświadczeniu metoda polega na spektrofotometrycznym pomiarze szybkości hydrolizy substratu (*p*-nitroanilidu-D,L-argininy) przez trypsynę (enzym), której miarą jest przyrost absorbancji uwalnianego chromoforu (*p*-nitroaniliny) w czasie.

Odczynniki i sprzęt laboratoryjny:

1. Spektrofotometr UV-Vis
2. Kuwety plastikowe
3. Roztwór podstawowy bydlęcej *β*-trypsyny (7 mg w 1 mL 1 mM HCl z dodatkiem 20 mM $CaCl_2$, pH 3,0)
4. Roztwór substratu chromogenicznego (*p*-nitroanilidu benzoilio-D,L-argininy) (stężenie roztworu podstawowego 5 mg/mL DMSO)
5. Bufor weronalowy o stężeniu 40 mM z dodatkiem 20 mM $CaCl_2$ (pH 8,3)
6. Roztwór NPGB (*p*-guanidynobenzoesan *p*'-nitrofenylu) (0,8 mg związku rozpuszczonego w mieszaninie złożonej z 100 μL DMF i 400 μL acetonitrylu)
7. Bufor 50 mM Tris/HCl zawierający 20 mM $CaCl_2$ oraz Tritonu X-100, pH 8,3
8. Pipety miarowe automatyczne 20-200 μL i 500-5000 μL

1. Wyznaczenie stężenia aktywnej formy enzymu

Wyznaczanie stężenia roztworu podstawowego bydlęcej *β*-trypsyny przeprowadza się poprzez miareczkowanie centrów aktywnych enzymu za pomocą tzw. substratu wybuchowego (*ang. burst kinetics substrate*), jakim jest *p*-guanidynobenzoesan *p*'-nitrofenylu (NPGB). Wprowadzenie trypsyny do buforu zawierającego NPGB, powoduje gwałtowny przyrost absorbancji (tzw. „wybuch barwy"). Podczas reakcji hydrolizy katalizowanej przez bydlęcą *β*-trypsynę, uwolniony zostaje *p*-nitrofenol (barwa żółta), którego absorbancja mierzona przy długości fali λ = 410 nm jest proporcjonalna do stężenia enzymu.

Miareczkowanie roztworu bydlęcej *β*-trypsyny przeprowadza się w jednorazowych kuwetach polistyrenowych zawierających 1,5 mL buforu weronalowego. Do kuwety z buforem dodać 20 μL roztworu NPGB, wymieszać, kuwetę umieścić w spektrofotometrze i wyzerować wartość absorbancji. Następnie do kuwety dodać 50 μL roztworu podstawowego trypsyny, wymieszać, kuwetę umieścić w spektrofotometrze i zmierzyć wartość absorbancji *p*-nitrofenolu przy długości fali 410 nm. Wykonać 5 takich pomiarów. Następnie, korzystając z prawa Lamberta Beera, obliczyć stężenie aktywnej formy trypsyny. Odpowiedni wzór po uwzględnieniu rozcieńczeń przedstawia się następująco:

$$C = \frac{\Delta A}{16595} \times \frac{1570}{50} \ [\mathrm{mol/dm^3}]$$

ΔA – średnia wartość wyników absorbancji

Przy obliczeniach przyjąć wartość molowego współczynnika absorpcji *p*-nitrofenolu jako 16595 $dm^3 \times mol^{-1} \times cm^{-1}$.

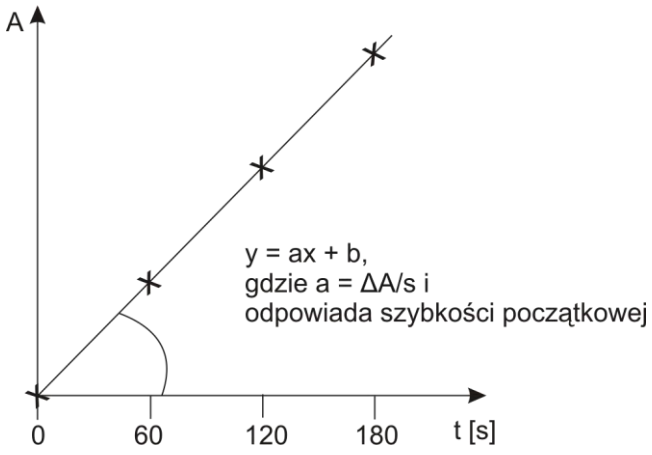
2. Standaryzacja roztworu podstawowego substratu

Przygotować 5 jednorazowych kuwet polistyrenowych zawierających po 1,5 mL buforu 0,1 M Tris/HCl z dodatkiem 20 mM $CaCl_2$ oraz Tritonu X-100, pH 8,3. Dodać odpowiednio 5, 10, 15, 20 i 25 μL roztworu podstawowego substratu chromogenicznego (*p*-nitroanilidu-D,L-argininy) o stężeniu 5 mg/mL dimetylosulfotlenku (DMSO). Następnie, do kuwet dodać po 20 μL 2-krotnie rozcieńczonego roztworu podstawowego trypsyny. Reakcję hydrolizy prowadzić do momentu uzyskania stałej wartości absorbancji przy 410 nm – **pomiary wykonać na końcu ćwiczeń**. Stężenie substratu obliczyć zgodnie z prawem absorpcji Lamberta-Beera, stosując molowy współczynnik absorpcji dla *p*-nitroaniliny wynoszący 9800 $M^{-1} \times cm^{-1}$.

3. Procedura wyznaczania parametrów kinetycznych

Do 5 jednorazowych kuwet polistyrenowych zawierających po 1,5 mL buforu 0,1 M Tris/HCl z dodatkiem 20 mM $CaCl_2$ oraz Tritonu X-100, pH 8,3, dodać 5, 10, 15, 20 i 25 μL roztworu podstawowego substratu chromogenicznego (*p*-nitroanilidu-D,L-argininy). Następnie do pierwszej kuwety dodać 20 μL 2-krotnie rozcieńczonego roztworu podstawowego trypsyny. Kuwetę umieścić natychmiast w spektrofotometrze i zarejestrować wartości absorbancji w następujących odstępach czasu: 0 sekund, 60 sekund, 120 sekund i 180 sekund. Opisaną procedurę powtórzyć dla pozostałych czterech kuwet.

Na podstawie zmierzonych wartości absorbancji wyznaczyć w oparciu o równanie regresji liniowej początkowe szybkość hydrolizy substratu (rys. 3).



Rys. 3. Wyznaczanie początkowych szybkości hydrolizy (V)

Otrzymane wartości początkowych szybkości hydrolizy (V) wyznaczone przy zmieniającym się stężeniu substratu, wyrażone w jednostkach absorbancji na minutę (A/s), przeliczyć - korzystając z prawa Lamberta Beera - na wartości początkowych szybkości hydrolizy wyrażonych w mol/s.
Dla wyznaczonych wartości V i [S] obliczyć 1/V oraz 1/[S] i wyniki umieścić w tabeli:

	y		x
V	1/V	[S]	1/[S]

Na podstawie danych zawartych w tabeli narysować krzywą Lineweavera-Burka stanowiącą graficzne rozwiązanie równania (13). Wyznaczyć równanie regresji liniowej, gdzie $a = K_M/V_{max}$ i $b = 1/V_{max}$, a następnie obliczyć V_{max} i K_M, oraz znając stężenie enzymu (E_C), obliczyć wartość $k_{cat} = V_{max}/E_C$ oraz wartość stałej specyficzności k_{cat}/K_M. **Dla wszystkich wartości podać jednostki**.